

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 195 40 487 A 1

⑤ Int. Cl.⁶:
C 12 N 5/00
C 12 N 5/08
C 12 M 3/00

⑲ Aktenzeichen: 195 40 487.4
⑳ Anmeldetag: 20. 10. 95
㉑ Offenlegungstag: 24. 4. 97

DE 195 40 487 A 1

㉒ Anmelder:

Schultz, Olaf, 10119 Berlin, DE; Burmester, Gerd R.,
Prof. Dr.med., 12277 Berlin, DE; Sittinger, Michael,
Dr.rer.nat., 12349 Berlin, DE

㉓ Vertreter:

Wehlan, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 10247
Berlin

㉔ Erfinder:

gleich Anmelder

㉕ Entgegenhaltungen:

DE 35 30 440 A1
DE 34 10 631 A1
DE 32 28 047 A1
US 52 68 480

US 50 81 035
WO 95 01 810 A1
WO 94 18 307 A1
WO 94 08 282 A1
WO 93 18 171 A1
WO 88 08 305 A1
WO 95 30 742
WO 85 30 388
WO 93 19 188

WEIBEZAHN, K.F., u.a.: Ein in vitro Gewebemodell in
mechanisch gefertigten Mikrostrukturen. In:
BIOforum 3, 1994, S.49-54;
Chemical Abstracts: Ref.295187g, Vol.120, 1994;
Ref. 5350e, Vol.112, 1990;
Exp. Cell Res. 1994, 212 (1), S.97-104;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉖ Zellinteraktionssystem zur Induktion künstlicher Gewebe

㉗ Die Erfindung betrifft Zellinteraktionssysteme zur Induktion künstlicher Gewebe, die zur Herstellung vitaler Transplantate oder zur Etablierung von Krankheitsmodellen geeignet sind. Derartige Zellinteraktionskultursysteme für in vitro Organ- und Gewebemodelle werden zur Herstellung von Zellgeweben mit Hilfe dreidimensionaler - eine extrazelluläre Matrix aufweisender - Trägerstrukturen verwendet. Die ange Interaktion artifizierter Gewebe erlaubt den Aufbau von Modellen für Erkrankungen, wobei an den Grenzonen Zell- und Matrixveränderungen durch äußere Einflüsse, z. B. durch Medikamentengabe, geprüft werden können.

DE 195 40 487 A 1

Die Erfindung betrifft Zellinteraktionssysteme zur Induktion künstlicher Gewebe zum Zwecke der Herstellung vitaler Transplantate oder zur Etablierung von Krankheitsmodellen. Derartige Zellinteraktionszellkultursysteme für in vitro Organ- und Gewebemodelle eignen sich zur Herstellung dreidimensionaler Zellgewebe mit Hilfe dreidimensionaler Trägerstrukturen, die die Bildung einer extrazellulären Matrix (ECM) erlauben, aber zunächst selbst noch keine ECM aufweisen. Die enge Interaktion artifizierter Gewebe ermöglicht den Aufbau von Modellen für Erkrankungen, wobei an den Grenzonen Zell- und Matrixveränderungen durch äußere Einflüsse, z. B. durch Medikamentengabe, geprüft werden können.

Es sind zahlreiche Zellkultursysteme bekannt, in denen eine extrazelluläre Matrix (ECM) beschrieben worden ist. So wird in der Patentschrift DE 34 10 631 ein Implantationsmaterial zur Wiederherstellung defekter Knorpel oder Knochen vorgestellt, das entweder in Gelform oder eingebettet in natürliches oder künstliches Knochenmaterial vorliegt. Das Gel enthält embryonale artspezifische Chondrocyten oder Mesenchymzellen und vorzugsweise auch eine extrazelluläre Matrix von Chondrocyten und Wachstumshormone. In der US (US-Patentschrift) 4801299 werden Körperimplantate in Form einer extrazellulären Matrix auf der Basis von Kollagen vorgeschlagen.

Eine Methode zur Gewebe-Regenerierung mit Hilfe einer extrazellulären Matrix-Induktion bildet den Gegenstand der US 4935000. Extrazelluläre Matrices finden weiterhin im Zusammenhang mit der Wiederherstellung der menschlichen Haut kosmetischen Kompositionen (US 5055298) sowie auf Kollagen- oder Fibronectin-Basis zum Anheften von T-Zellen (US 5188959 und 5354686) Verwendung. Kollagen (Typ I) als Grundmatrix für die stationäre Phase bipolar adhärrierter Hepatozyten einer Zellkultur wird in der DE 43 36 399 beschrieben.

Die funktionelle Immobilisierung von Enzymen, Proteinen und ganzen Zellen auf festen, biokompatiblen Trägermaterialien mittels elektrostatischer Wechselwirkung zwischen der Oberflächenbeschichtung des Festkörpers und dem zu fixierenden Adsorbat bildet den Gegenstand der DE 43 23 487. In der WO 92/20780 (DE 41 16 727) wird die gleichzeitige Kultivierung unterschiedlicher Säugerzellen, die separate Gewinnung verschiedener Säugerzellprodukte sowie die Modellierung von Organwechselwirkungen auf humoraler Ebene beschrieben.

Bei der Herstellung von Implantaten sind Verfahren bekannt geworden, die von Polymerfaserbündeln aus resorbierbarem Material ausgehen, auf das isolierte und vermehrte Zellen gebracht und die Bündel implantiert werden (C.A. Vacanti et al, Plastic and Reconstructive Surgery, Vol. 8, No. 5, 1991, 753-759). Auch in der WO 90/12603 werden dreidimensionale Trägerstrukturen genannt, die in der Form des zu ersetzenden Organs ausgebildet und mit den gewünschten Zellen versetzt sind.

Mit der DE 43 06 661 schließlich wird die Herstellung eines Implantates aus Zellkulturen beansprucht. Demnach werden Knorpelzellen auf eine resorbierbare, vorgeformte, dreidimensionale Trägerstruktur — die der gewünschten Struktur des Implantates entspricht — gebracht und die Struktur mit einem Material ummantelt, durch das eine Nährlösung diffundieren kann. Auf diese

Weise läßt sich durch ein Aneinanderbinden von Zellen eine interzelluläre Matrix ausbilden.

Derartige dreidimensionale Trägerstrukturen stehen jedoch vor der Schwierigkeit, die Zellen im Inneren des Implantates ausreichend mit Nährstoffen zu versorgen.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die Etablierung von Zellinteraktionssystemen zu ermöglichen, die zur Induktion künstlicher Gewebe zu funktionalen Geweben geeignet sind. Die Aufgabe wurde dadurch gelöst, daß dreidimensionale Kulturen, die eine extrazelluläre Matrix besitzen oder entwickeln, miteinander über Membranen verbunden sind oder in direktem Kontakt stehen oder miteinander vermengt sind. So erfolgt die Induktion eines artifizierten Zellgewebes zu z. B. Knorpel- oder Knochengewebe durch transfixierte Zellkulturen oder dreidimensionale Kulturen von Periost- oder Perichondriumzellen.

Das erfindungsgemäße Zellinteraktionssystem (Fig. 1) besteht aus der Nährlösung/dem Kühlbehälter 1, der Tropfenbildungskammer 2, der Mischungskammer 3, der Perfusionskammer 4 (mit Wärmeplatte), der Mengennesseinrichtung 5 (optische Kontrolle), der Probeentnahme 6, der Mediumauslaufkammer 7 und dem Interface/PC 8.

Erfindungsgemäß werden dreidimensionale Zellgewebe mit Hilfe dreidimensionaler Trägerstrukturen, z. B. resorbierbare Polymervliese, hergestellt. Für die Herstellung eines Knorpelgewebes z. B. werden entdifferenzierte (vermehrte) Knorpelzellen oder undifferenzierte mesenchymale Vorläuferzellen verwendet. Differenzierte Knorpelzellen vom Patienten stehen normalerweise nur in geringer Menge (operativer Eingriff notwendig) zur Verfügung.

Um ein differenzierendes Mikromilieu zu schaffen, wird a) eine undifferenzierte Zellsuspension mit körpereigenen Zellen oder Zellaggregaten eines definierten (differenzierten) Phänotyps gemischt, werden b) definierte (z. B. differenzierte) oder genetisch manipulierte körperfremde Zellen in einem Gel oder Vlies suspendiert und um das Gewebe herum bzw. direkt an das zu differenzierende Gewebe gelagert.

Die Anordnung dieses Verfahrens stellt eine definierte Kontaktzone zwischen zwei artifizierten dreidimensionalen Zellgeweben her. Diese Kontaktzone dient als Testsystem für Erkrankungen. An den Grenzonen können Zell- und Matrixveränderungen, z. B. bei der Gabe von Medikamenten, geprüft werden.

Die erfindungsgemäßen Interaktionszellkultursysteme eignen sich zur Verwendung als in vitro Organ- und Gewebemodelle.

Überraschenderweise hat sich herausgestellt, daß z. B. die Induktion eines artifizierten Zellgewebes zu Knorpel- oder Knochengewebe durch transfixierte Zellkulturen oder dreidimensionale Kulturen von Periost- oder Perichondriumzellen, die eine extrazelluläre Matrix entwickeln oder besitzen, den Aufbau von Modellen für Erkrankungen erlauben, bei denen insbesondere die extrazelluläre Matrix eine Rolle spielt.

Fig. 2 zeigt Zell- und Gewbeanordnungen:

Serielle Kultur: Faktoren aus dem Gewebe (links) wirken auf das Gewebe rechts. Der Faktor aus dem Gewebe rechts wirkt nicht auf das Gewebe links.

Sandwich-Kultur: Zwei oder mehrere künstliche Gewebe liegen übereinander oder aneinander (Kontaktzonen).

Integrierte Kultur: Dabei handelt es sich um eine Mischung unterschiedlicher Zellen zum Zwecke der Differenzierung eines Gewebes.

Fließende Zellen: Ein Gemisch suspendierter Zellen (z. B. Lymphozyten oder auch Mikroorganismen) strömen entlang eines artifiziellen Gewebes (z. B. Endothel) und haften dort an, wenn die Zellen passende Rezeptoren exprimieren.

Fig. 3 oberes Bild: Der Zweck der Zellmischung besteht darin, mit den wenigen vorhandenen differenzierten bzw. differenzierenden Zellen möglichst viele der undifferenzierten Zellen zu differenzieren.

80% der undifferenzierten mesenchymalen Zellen und 20% der differenzierten Knorpelzellen befinden sich zusammen in einem Gewebe (Gewebe 1).

Körperfremde oder genetisch manipulierte Zellen werden, wenn sie differenzierende Faktoren produzieren, um das Gewebe 1 herum angeordnet.

— unteres Bild (Kontaktzone): Bei der rheumatoiden Arthritis zerstören synoviale Zellen in den Gelenken der Patienten den Gelenkknorpel, indem seine Oberfläche und extrazelluläre Matrix zerstört werden und schließlich synoviale Zellen in den Knorpel eindringen.

Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Dreidimensionales Zellgewebe

Ein dreidimensionales Zellgewebe wird mit Hilfe dreidimensionaler Trägerstrukturen (resorbierbares Polymervlies) hergestellt. Für die Herstellung eines Knorpelgewebes werden (a) entdifferenzierte (vermehrte) Knorpelzellen oder (b) undifferenzierte mesenchymale Vorläuferzellen verwendet. Die in der Vliesstruktur zu verteilenden Zellen werden dabei erst in einer Fibrinogenlösung suspendiert. Die Zellsuspension wird in den Vliesträger gefüllt und durch Thrombinzugabe verfestigt.

Beispiel 2

Differenzierendes Mikromilieu

Um ein differenzierendes Mikromilieu zu schaffen, wird (A) eine undifferenzierte Zellsuspension mit körpereigenen Zellen oder Zellaggregaten eines differenzierten Phänotyps 5 : 1 gemischt, (B) differenzierte aber körperfremde Zellen in einem Gel oder Polymervlies suspendiert und um das Gewebe herum bzw. direkt an das zu differenzierende Gewebe angelagert.

Das differenzierende Mikromilieu kann

1. durch differenzierte Knorpelzellen
2. mit BMP (bone morphogenetic protein) transfizierten Zellen
3. mit allen Zellen (Periost und Perichondriumzellen), Geweben (Periost, Synovia) oder Gewebekomponenten (Matrix), die parakrin Knorpel-differenzierende Faktoren produzieren oder freisetzen, geschaffen werden. Derzeit bekannte Faktoren sind z. B. bone morphogenetic proteins, cartilage driven morphogenetic proteins, transformig growth factor beta (Luyten, F.P. et al., Acta Orthop. Belg., 58 Suppl. 1 (1992) 263—267; Exp. Cell Res. 1994, 210: 224—9; Chang, S.C. et al., J. Biol. Chem. 1994, 269: 28227—28234).

Die Anordnung dieses Verfahrens stellt eine definierte Kontaktzone zwischen zwei artifiziellen dreidimensionalen Zellgeweben her.

Beispiel 3

Modell Rheumatoide Arthritis

Aggressive Zellen aus der Synovia eines Patienten mit rheumatoider Arthritis (3D-Gewebe 1) invadieren das Knorpelzellgewebe (3D-Gewebe 2) in vitro.

Beispiel 4

Knorpelgewebe

Vermehrte Knorpelzellen oder mesenchymale Vorläuferzellen unterschiedlichen Reifungs- und Differenzierungsgrades werden in einer Fibrinogenlösung suspendiert, die Zellsuspension in einem resorbierbaren Polymervlies verteilt, Faktoren oder Komponenten der entsprechenden extrazellulären Matrix, die dem Wachstums- und Differenzierungsprozeß förderlich sind, zugesetzt und durch Thrombinzugabe verfestigt und einem differenzierenden Mikromilieu ausgesetzt.

Beispiel 5

Knochengewebe

Zellen osteogenen Ursprungs unterschiedlichen Reifungs- und Differenzierungsgrades oder mesenchymale Vorläuferzellen werden in einer Fibrinogenlösung suspendiert, die Zellsuspension in einem resorbierbaren Polymerkonstrukt verteilt, Faktoren oder Komponenten der entsprechenden extrazellulären Matrix, die dem Wachstums- und Differenzierungsprozeß förderlich sind, zugesetzt und durch Thrombinzugabe verfestigt und einem differenzierenden Mikromilieu ausgesetzt.

Beispiel 6

Modell "Rheumatoide Arthritis/in-vitro Pannusgewebe"

Zellen der Synovialmembran eines Patienten mit rheumatoider Arthritis (3D-Gewebe 1) treten wie im Beispiel 3 mit Knorpelzellgewebe (3D-Gewebe 2) in vitro in Wechselwirkung.

Patentansprüche

1. Zellinteraktionssystem zur Induktion künstlicher dreidimensionaler Gewebe, dadurch gekennzeichnet, daß Kulturen, die eine extrazelluläre Matrix besitzen oder entwickeln, miteinander über Membranen verbunden sind oder in direktem Kontakt stehen oder miteinander vermengt sind.
2. Zellinteraktionssystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zur Induktion eines artifiziellen Zellverbandes zu Knorpel- oder Knochengewebe genetisch manipulierte Zellen oder dreidimensionale Kulturen von Periost- oder Perichondriumzellen in einem differenzierenden Mikromilieu Verwendung finden.
3. Zellinteraktionssystem nach Anspruch 1, bestehend aus einer Perfusionskammer mit Wärmeplatte, einer Nährlösung und Kühlbehälter, einer Tropfenbildungskammer, einer Mischungskammer, ei-

ner Mengenmessungseinrichtung zur optischen Kontrolle, einer Probeentnahmeeinrichtung, einer Mediumauslaufkammer und einem Interface/PC.

4. Verfahren zur Herstellung eines Knorpelgewebes mit Hilfe des Zellinteraktionssystems nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß vermehrte Knorpelzellen oder mesenchymale Vorläuferzellen unterschiedlichen Reifungs- und Differenzierungsgrades in einer Fibrinogenlösung suspendiert, die Zellsuspension in einem resorbierbaren Polymervlies verteilt, Faktoren oder Komponenten der entsprechenden extrazellulären Matrix, die dem Wachstums- und Differenzierungsprozeß förderlich sind, zugesetzt werden und durch Thrombinzugabe verfestigt und einem differenzierenden Mikromilieu ausgesetzt werden.

5. Verfahren zur Herstellung eines Knochengewebes mit Hilfe des Zellinteraktionssystems nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß Zellen osteogenen Ursprungs unterschiedlichen Reifungs- und Differenzierungsgrades oder mesenchymale Vorläuferzellen in einer Fibrinogenlösung suspendiert, die Zellsuspension in einem resorbierbaren Polymerkonstrukt verteilt, Faktoren oder Komponenten der entsprechenden extrazellulären Matrix, die dem Wachstums- und Differenzierungsprozeß förderlich sind, zugesetzt werden und durch Thrombinzugabe verfestigt und einem differenzierenden Mikromilieu ausgesetzt werden.

6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erzeugung eines differenzierenden Mikromilieus eine Suspension vorher vermehrter, undifferenzierter Zellen mit autologen Zellen oder Zellaggregaten eines definierten Phänotyps gemischt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erzeugung eines differenzierenden Mikromilieus eine Suspension vorher vermehrter, undifferenzierter Zellen in direkten Kontakt mit einem Gel oder Polymervlies, das differenzierte, körperfremde Zellen enthält, gebracht wird.

8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das differenzierende Mikromilieu

- a) durch differenzierte Knorpelzellen
- b) mit BMP (bone morphogenetic Protein), TGF oder verwandte Faktoren produzierende Zellen, wobei diese in unterschiedlicher Weise zweckentsprechend genetisch manipuliert sein können,
- c) durch alle Zellen (z. B. Periost- oder Perichondriumzellen), Gewebe (Periost, Synovia) oder Gewebekomponenten (Matrix), die knorpeldifferenzierende Faktoren produzieren oder freisetzen, erzeugt wird.

9. Verwendung des Zellinteraktionssystems nach Anspruch 1 bis 3 zur Induktion künstlicher Gewebe.

10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Herstellung vitaler Transplantate dient.

11. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es zur in-vitro Simulation pathogenetischer Prozesse und zur Etablierung von Krankheitsmodellen dient.

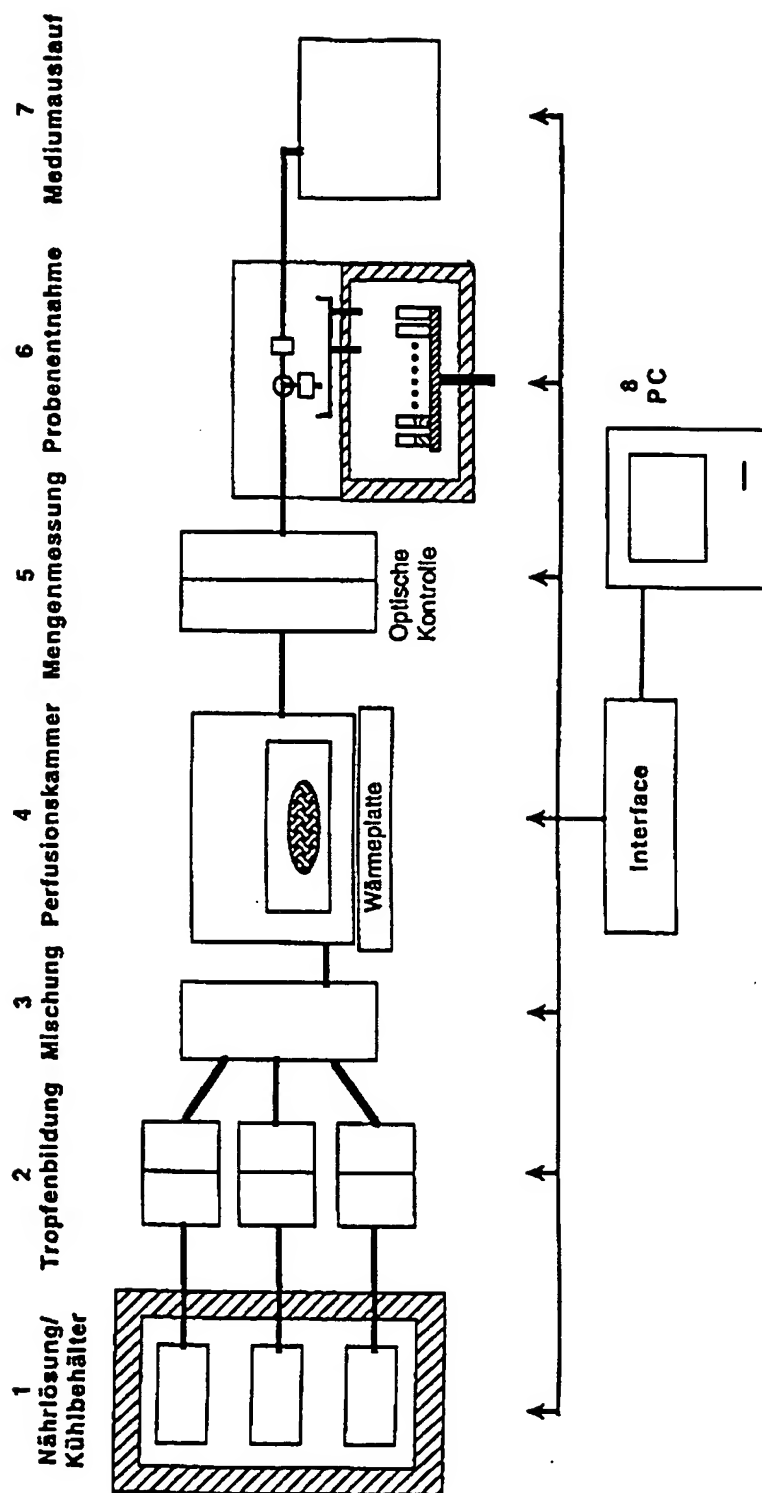
12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß zur Etablierung des Modells "Rheumatoide Arthritis/in-vitro Pannusgewebe" Zellen der Synovialmembran eines Patienten mit

rheumatoider Arthritis (3D-Gewebe 1) mit Knorpelzellgewebe (3D-Gewebe 2) in vitro in Wechselwirkung treten.

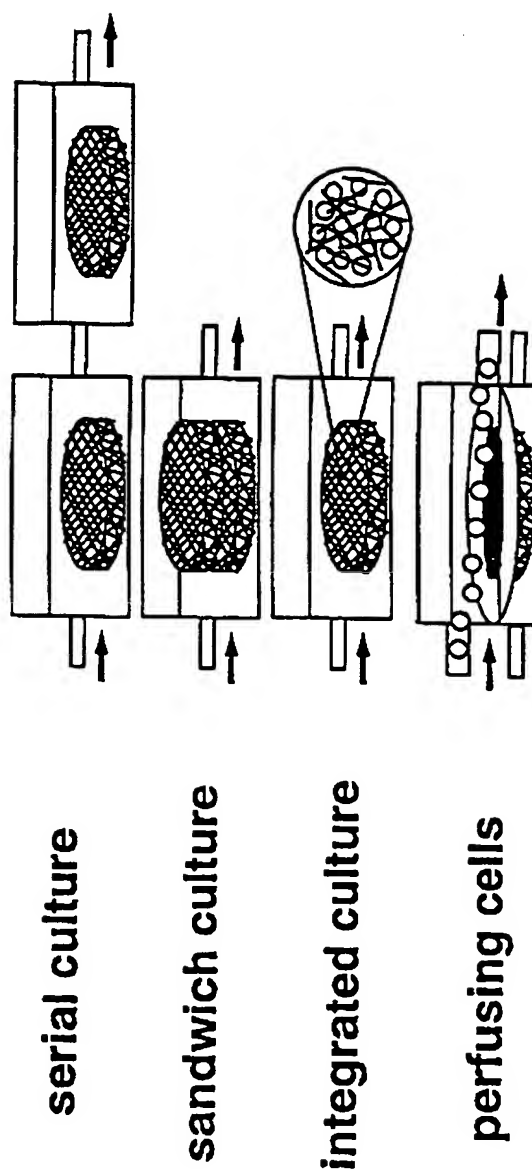
Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

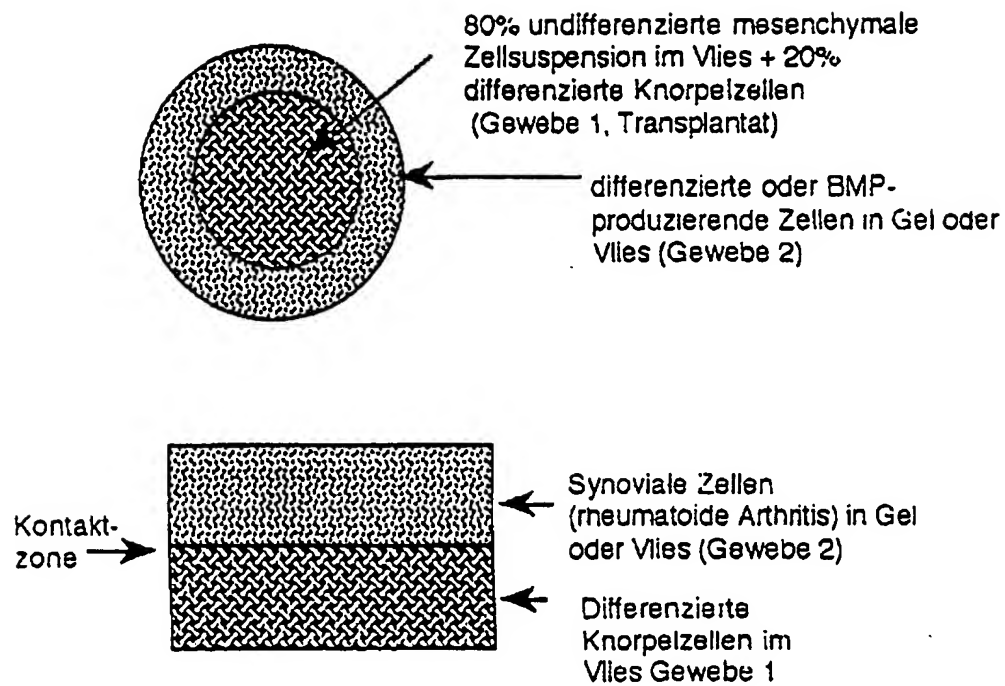
Figur 1



Figur 2



Figur 3



Cell interaction system for induction of artificial 3-dimensional tissue

Patent Number: DE19540487

Publication date: 1997-04-24

Inventor(s): SCHULTZ OLAF (DE); BURMESTER GERD R PROF DR MED (DE); SITTINGER MICHAEL DR RER NAT (DE)

Applicant(s): SCHULTZ OLAF (DE); BURMESTER GERD R PROF DR MED (DE); SITTINGER MICHAEL DR RER NAT (DE)

Requested Patent: ☐ DE19540487

Application Number: DE19951040487 19951020

Priority Number (s): DE19951040487 19951020

IPC Classification: C12N5/00; C12N5/08; C12M3/00

EC Classification: C12N5/06B20

Equivalents:

Abstract

Cell interaction system for induction of artificial 3-dimensional tissue comprises cultures, which comprise or develop an extracellular matrix and which are bound together through membranes or are in direct contact with one another or are mixed with one another. Also claimed are: (1) a method (a) for producing cartilage tissue using a system as above, comprising: (a) suspending cartilage cells or mesenchymal progenitor cells of different maturity and degree of differentiation in a fibrinogen solution, (b) distributing the suspension in a bioabsorbable polymer web, (c) adding factors or components of the corresponding extracellular matrix to promote growth and differentiation, (d) solidifying the composition by adding thrombin and (e) exposing the composition to a differentiating micro-medium; (2) a method (B) for producing bone tissue using osteogenic cells of different maturity and degree of differentiation in a fibrinogen solution and the method of (A).

Data supplied from the esp@cenet database - I2